

⑬ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

⑪ N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 772 382

⑫ N° d'enregistrement national : 97 15702

⑤ Int Cl<sup>6</sup> : C 08 B 37/02, A 61 K 31/715

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫ Date de dépôt : 11.12.97.

③ Priorité :

④ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 18.06.99 Bulletin 99/24.

⑤ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦ Demandeur(s) : SOLUTIONS Societe anonyme — FR.

⑧ Inventeur(s) : CHAUBET FREDERIC, HUYNH REMI,  
DAHRI LATIFA, CORREIA JOSE, JOZEFOWICZ MAR-  
CEL et JOZEFOWICZ JACQUELINE.

⑨ Titulaire(s) :

⑩ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑪ DERIVES DE DEXTRANE, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS COMME  
MEDICAMENTS A ACTION BIOLOGIQUE SPECIFIQUE.

⑫ Dérivés de dextrane, leurs applications comme médi-  
caments à action biologique spécifique, ainsi que leur pro-  
cédé de préparation.

Ces dérivés présentent la formule générale  $DMC_aB_b-$   
 $Su_cS_d$ , dans laquelle:

D représente une chaîne polysaccharidique, de préfé-  
rence constituée par des enchainements d'unités glucosidi-  
ques, MC représente des groupes méthylcarboxylates, B  
représente des groupes carboxyméthylbenzylamides, Su  
représente des groupes sulfates, S représente des groupes  
sulfonates, a, b, c et d représentent le degré de substitution  
(ds), respectivement en groupements MC, B, Su et S; a  
étant égal à 0 ou  $\geq$  à 0.3, b étant égal à 0 ou  $\geq$  à 0.1, c étant  
 $\geq$  à 0.1 et d étant égal à 0 ou  $\leq$  à 0.15, à condition que lors-  
que d=0, a et/ou b sont  $\neq$  0, lesquels produits présentent  
une homogénéité de la distribution des tailles de chaînes, il-  
lustrée par un profil d'élution de type gaussien symétrique  
en chromatographie d'exclusion stérique haute performan-  
ce et une homogénéité de la distribution des groupements  
chimiques chargés, illustrée par un profil d'élution à un seul  
pic symétrique en chromatographie d'échange d'ions basse  
pression.

FR 2 772 382 - A1



La présente invention est relative à des dérivés de dextrane, et à leurs applications comme médicaments à action biologique spécifique, telle qu'une action cicatrisante, une action anti-complémentaire (substitut du plasma), une action modulateur de la prolifération ou une action anticoagulante et plus spécifiquement une action anti-thrombotique, ainsi qu'à leur procédé de préparation.

Différents dextrans substitués par des chaînes latérales portant des groupes carboxylates et sulfonates ont été décrits. En particulier le Brevet français 2 461 724 et le Brevet français 2 555 589 décrivent des dextrans substitués par lesdits groupes, présentant respectivement des propriétés anticoagulantes et des propriétés anticoagulantes et antiinflammatoires ; le Brevet européen 0 462 194 décrit les propriétés de régénération cellulaire et tissulaire de tels dextrans substitués.

Il a également été montré que de tels dextrans substitués pouvaient présenter d'autres activités biologiques, en fonction du taux de substitution par lesdits groupes ; en particulier, le Brevet européen 0 514 449 décrit des dextrans substitués par des groupes carboxyméthyle (CM) et carboxyméthylbenzylamide sulfonate de formule générale  $D_X CM_Y BS_Z$ , dans laquelle X, qui représente le nombre moyen d'unités saccharidiques non substituées pour 100 unités saccharidiques, est inférieur ou égal à 50, Y, qui représente le nombre moyen de groupes carboxyméthyle pour 100 unités saccharidiques, est compris entre 10 et 90 et Z, qui représente le nombre moyen de groupes carboxyméthylbenzylamide sulfonate pour 100 unités saccharidiques, est compris entre 15 et 35, pour l'obtention d'un agent inhibiteur de la croissance des cellules tumorales.

Ces différents dérivés, dont la structure est résumée sur la figure 1, sont généralement obtenus par substitution statistique du dextrane avec trois groupes différents : carboxyméthyle (CM), carboxyméthylbenzylamide (B) et carboxyméthylbenzylamide sulfonate (S) (sulfonation sur le noyau aromatique par l'acide chlorosulfonique).

De manière plus précise :

a) la carboxyméthylation du dextrane (production de CMD) est réalisée en milieu aqueux basique, par action de l'acide monochloroacétique. Trois réactions successives de carboxyméthylation sont nécessaires pour obtenir un degré de substitution du dextrane (ds) compris entre 0,7 et 1,1 ;

b) le couplage de la benzylamine sur les groupes carboxyméthyles (production de CMDB) :

Le principe de cette réaction classique est fondé sur l'aptitude de la fonction carboxylate à former un anhydride mixte instable capable de réagir avec un réactif portant une fonction amine primaire ( $R-NH_2$ ). Deux procédés différents ou réactions d'activation ont été utilisés pour aboutir à la formation d'un anhydride mixte :

- action du chloroformate d'isobutyle (CIB) ou
- action du N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1-2 dihydroquinoléine (EEDQ).

Dans les deux cas, la réaction est mise en oeuvre dans un milieu hétérogène, respectivement eau/diméthylformamide ou eau/éthanol.

Ces deux procédés de couplage donnent des degrés de substitution (ds) semblables, avoisinant 0,08 à 0,12, en une seule étape. Dans le cas du couplage par l'EEDQ, le ds peut atteindre 0,25 à 0,30 %, en une seule étape, lorsque l'on procède à l'activation du produit intermédiaire à une température de 30 à 40°C.

Comme pour la carboxyméthylation, pour atteindre des ds de benzylamine souhaités élevés, il n'est pas possible d'augmenter les concentrations des différents réactifs. Il est donc nécessaire de faire des couplages successifs pour améliorer le rendement de la réaction. Le CMDB précipité, lavé et séché après le premier couplage va subir un second et/ou un troisième couplage exactement dans les mêmes conditions que le premier, sans considération des substitutions dues au premier couplage.

c) sulfonation ou sulfatation

Elle se fait par action de l'acide monochlorosulfonique sur le CMDB, en milieu organique anhydre (dichlorométhane, par exemple) et en phase hétérogène, le CMDB n'étant pas soluble dans le dichlorométhane. Il est nécessaire d'opérer la réaction en excès d'acide monochlorosulfonique, tout en évitant une hydrolyse acide de la chaîne polysaccharidique.

Les rapports  $[HSO_3Cl]/[\text{unités B fixées}]$  pour les CMDB et  $[HSO_3Cl]/[OH \text{ libres}]$  pour le CMD varient entre 0,8 et 3.

Pour obtenir essentiellement une sulfonation des noyaux aromatiques (unités B), le rapport molaire  $[HSO_3Cl]/[\text{unités B fixées}]$  doit être égal à 3, alors

que pour obtenir une sulfatation des fonctions hydroxyles portées par les unités glucosidiques (production de fonctions sulfates), le rapport molaire  $[\text{HSO}_3\text{Cl}]/[\text{OH libres}]$  est de l'ordre de 1. Dans tous les cas, la concentration en acide chlorosulfonique dans le milieu réactionnel ne doit pas dépasser 0,15 M. Dans ces conditions, le pourcentage d'unités portant une fonction sulfonate dépend du pourcentage d'unités substituées par des groupes benzamide. Une étude récente (MAIGA-REVEL O. et al., *Carbohydrates Polymers*, 1997, 32, 89-93) a montré que l'activité anticoagulante des dérivés de dextrane CMDSu (=carboxyméthyl-dextrans sulfate) et CMDBS (=carboxyméthyl-dextrans benzamide sulfonate) de l'Art antérieur dépend de leur teneur en soufre ; toutefois, les CMDBS présentent une activité anticoagulante supérieure à celle obtenue avec les CMDSu, pour une teneur en soufre identique.

Les dérivés de dextrane obtenus dans les conditions définies ci-dessus, ont l'inconvénient de présenter une distribution irrégulière des groupements chimiques et des tailles des chaînes polysaccharidiques, conduisant à un produit final hétérogène, dont il est difficile de contrôler les propriétés.

Les Inventeurs ont mis au point un nouveau procédé de préparation de dérivés de dextrane, qui permet de mieux maîtriser la production de produits spécifiquement définis (degré de substitution contrôlable, homogénéité de la distribution des groupements chimiques chargés ou non et homogénéité en taille des chaînes polysaccharidiques du produit final, sélection et meilleure reproductibilité de l'activité recherchée).

La présente invention a pour objet des dérivés de dextrane de formule générale  $\text{DMC}_x\text{B}_y\text{Su}_z\text{S}_d$ , dans laquelle :

D représente une chaîne polysaccharidique, de préférence constituée par des enchaînements d'unités glucosidiques,

MC représente des groupes méthylcarboxylates,

B représente des groupes carboxyméthylbenzylamides,

Su représente des groupes sulfates (sulfatation des fonctions hydroxyles libres, portées par les unités glucosidiques),

S représente des groupes sulfonates (sulfonation des noyaux aromatiques),

$\underline{a}$ ,  $\underline{b}$ ,  $\underline{c}$  et  $\underline{d}$  représentent le degré de substitution (ds), respectivement en groupements MC, B, Su et S ;  $\underline{a}$  étant égal à 0 ou  $\geq$  à 0,3,  $\underline{b}$  étant égal à 0 ou  $\geq$  à 0,1,  $\underline{c}$  étant  $\geq$  à 0,1 et  $\underline{d}$  étant égal à 0 ou  $\leq$  à 0,15, à condition que lorsque  $\underline{d} = 0$ ,  $\underline{a}$  et/ou  $\underline{b}$  sont  $\neq 0$ , lesquels produits présentent une homogénéité de la distribution des  
5 tailles de chaînes, illustrée par un profil d'élution de type gaussien symétrique en chromatographie d'exclusion stérique haute performance et une homogénéité de la distribution des groupements chimiques chargés, illustrée par un profil d'élution à un seul pic symétrique en chromatographie d'échange d'ions basse pression.

On considère, ces produits comme étant des copolymères constitués  
10 de sous-unités fictives R-OH et R-OX, X pouvant être un groupement méthylcarboxylate (MC), benzylamide (B) ou sulfate (Su). La chaîne polysaccharidique est donc considérée comme étant constituée de 300 sous-unités fictives R-OH, au lieu de 100 % d'unités glucosidiques. Ainsi, un dextrane méthylcarboxylate (DMC) avec un degré de substitution (ds) de 1,2 en groupements méthylcarboxylates contient 1,20 groupement  
15 substitué (R-MC) et 1,80 groupement hydroxyle libre (R-OH), par unité glucosidique.

On obtient ainsi, et ce, contrairement aux produits hétérogènes de l'Art antérieur, des produits homogènes, de composition ciblée, dans lesquels les groupements chimiques bioactifs sont distribués le long des chaînes macromoléculaires selon un ordonnancement spécifique, conférant au produit, une propriété biologique  
20 que l'on ne retrouvera pas sur un produit de même composition globale, mais dans lequel la répartition desdits groupements le long des chaînes macromoléculaires est différente (préparation différente, notamment).

En d'autres termes, dans les dérivés de dextrane selon l'invention, la distribution des groupements chimiques confère au produit final une propriété biologique spécifique ; une telle distribution a pour conséquence que la composition  
25 chimique de chaque chaîne polysaccharidique est identique à la composition chimique globale du produit. De ce fait, il existe une composition chimique optimale pour une activité biologique spécifique maximale ; il y a donc une relation directe entre la propriété biologique considérée et la composition chimique globale du produit.

Par exemple :

- les dérivés de dextrane, de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , telle que définie ci-dessus, dans laquelle  $a \geq 0,6$ ,  $b \neq 0$ ,  $c \leq 0,5$  et  $d \leq 0,15$  ou  $d = 0$  sont essentiellement des agents cicatrisants, de préférence lorsqu'ils ont une masse molaire comprise entre 3.000 et 500.000 g/mole ; les dérivés de dextrane préférés en tant qu'agents cicatrisants sont ceux dans lesquels  $a$  est compris entre 0,7 et 0,9 ;  $c \leq 0,5$  et  $d \leq 0,15$  ou égal à 0 ;
- les dérivés de dextrane, de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , telle que définie ci-dessus, dans laquelle  $a \geq 0,3$ ,  $c \leq 0,4$  et  $d \leq 0,15$  ou égal à 0 sont essentiellement des agents à activité anti-complémentaire et substitut du plasma, de préférence lorsqu'ils ont une masse molaire comprise entre 10.000 et 60.000 g/mole ; les dérivés de dextrane préférés en tant qu'agents à activité anti-complémentaire et substitut du plasma sont ceux dans lesquels  $a$  est compris entre 0,40 et 1,15,  $b \leq 0,4$ ,  $c \leq 0,2$  et  $d \leq 0,15$  ou égal à 0 ;
- les dérivés de dextrane, de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , telle que définie ci-dessus, dans laquelle  $a \geq 0,5$ ,  $b \neq 0$ ,  $c \leq 0,4$  et  $d \leq 0,15$  sont essentiellement des agents modulateurs de la prolifération cellulaire, de préférence lorsqu'ils ont une masse molaire comprise entre 3.000 et 100.000 g/mole ; les dérivés de dextrane préférés en tant qu'agents modulateurs de la prolifération cellulaire sont ceux dans lesquels  $a$  est compris entre 0,5 et 1,2 ;  $b$  est compris entre 0,2 et 0,6 ;  $c$  est compris entre 0,1 et 0,4 et  $d \leq 0,15$  ou égal à 0 ; et
- les dérivés de dextrane, de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , telle que définie ci-dessus, dans laquelle  $a \geq 0,4$ ,  $c \geq 0,3$  et  $d \leq 0,15$  ou égal à 0 sont essentiellement des agents anti-coagulants, de préférence lorsqu'ils ont une masse molaire comprise entre 3.000 et 20.000 g/mole et une valeur de  $b \neq 0$ .

La présente invention a également pour objet des médicaments, caractérisés en ce qu'ils comprennent comme principe actif au moins un dérivé de dextrane tel que défini ci-dessus, éventuellement associé à un autre principe actif et/ou à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et/ou un support physiologiquement acceptable (liposome).

Les principes actifs associés sont choisis dans le groupe qui comprend les dextrans, les facteurs de croissance (par exemple FGF acide ou FGF basique), les anesthésiques locaux, les antiinfectieux, des protéines sériques et du collagène.

5 La présente invention a également pour objet un procédé de préparation (procédé 1) de dérivés du dextrane de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) **carboxyméthylation** comprenant (i) l'activation d'un dextrane non substitué, par mise en contact dudit dextrane avec un milieu hydro-alcoolique  
10 liquide biphasique basique pendant au moins 1 h sous agitation, (ii) addition de l'acide monochloroacétique au produit activé obtenu, à une température comprise entre 40 et 90°C, de préférence à 60°C, le rapport  $R_{MC}$ , égal au nombre de moles d'acide monochloroacétique/nombre de moles d'OH étant compris entre 0,3 et 2, (iii) isolement et éventuellement purification du dextrane méthylcarboxylate (DMC) obtenu.

15 b) **couplage de la benzylamine sur les groupes méthylcarboxylates** (benzylamidification) comprenant (i) la mise en contact, pendant au moins 2 h et en milieu aqueux acide, du DMC obtenu en a) avec une amine primaire (benzylamine), en présence d'une carbodiimide hydrosoluble telle que le 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl)-carbodiimide méta-*p*-toluène sulfonate (CMC) ou le chlorhydrate de 1-  
20 éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl)-carbodiimide (EDC) comme agent de couplage, à une température comprise entre 0°C et 30°C, le rapport molaire CMC/MC étant compris entre 0,25 et 2 et le rapport molaire benzylamine/MC étant compris entre 0,25 et 2, (ii) l'isolement du dextrane méthylcarboxyle benzylamide (DMCB) obtenu et éventuellement sa purification.

25 Une telle étape, réalisée en milieu homogène et en présence d'une carbodiimide hydrosoluble, comme réactif de couplage permet de mieux maîtriser la réaction et donc la préparation du produit final, présentant une homogénéité de la distribution des tailles de chaînes, illustrée par un profil d'élution de type gaussien symétrique en chromatographie d'exclusion stérique haute performance et une homo-  
30 généité de la distribution des groupements chimiques chargés, illustrée par un profil d'élution à un seul pic symétrique en chromatographie d'échange d'ions basse pression.

c) **sulfatation** comprenant (i) la formation d'un sel de trialkylammonium du DMCB obtenu en b), (ii) la solubilisation du sel obtenu dans un solvant polaire anhydre, généralement une base de Lewis (donneur d'électron), telle que le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou la diméthylformamide (DMF) et (iii) l'ajout audit sel en solution, d'un complexe à base de trioxyde de soufre tel que  $\text{SO}_3$ -pyridine,  $\text{SO}_3$ -triéthylamine ou  $\text{SO}_3$ -DMF en solution dans le même solvant, à température inférieure à  $70^\circ\text{C}$ , le rapport molaire complexe à base de trioxyde de soufre/OH libres étant compris entre 0,25 et 12, et éventuellement

d) une étape de sulfonation des groupes B par mélange sous agitation d'un dérivé DMCBSu en suspension dans un solvant anhydre avec de l'acide chlorosulfonique en solution dans le même solvant, à température comprise entre la température ambiante et la température d'ébullition du solvant utilisé.

De manière inattendue, le procédé selon l'invention permet de contrôler le degré de substitution du dextrane, en un nombre d'étapes significativement inférieur au nombre d'étapes des procédés de l'Art antérieur, pour obtenir des produits ayant un profil d'élution de type gaussien symétrique en chromatographie d'exclusion stérique haute performance et un profil d'élution à un seul pic symétrique en chromatographie d'échange d'ions basse pression et l'activité biologique recherchée, avec des rendements significativement supérieurs à ceux de l'Art antérieur.

En outre, le procédé selon l'invention permet de synthétiser de façon reproductible un produit de composition chimique souhaitée pour la propriété biologique retenue. Ainsi à une composition chimique donnée d'un produit correspond préférentiellement une activité biologique.

Par exemple, on obtient à l'étape a), directement un ds en MC de  $1,0 \pm 0,1$  par unité glucosidique et un rendement supérieur ou égal à 80 %, pour une valeur de  $R_{\text{MC}} = 0,85$ , dans un milieu mixte eau-tertio-butanol ou eau-isopropanol (15/85, v/v), sous agitation pendant 2 heures à  $60^\circ\text{C}$ , et ce, en une seule étape ; on obtient, à l'étape b), à partir d'un DMC de ds = 1 en MC, pour un rapport molaire CMC/MC de 0,75 et un rapport molaire benzylamine/MC de 1, et sous agitation à température ambiante pendant 16 heures, un produit DMCB ayant un ds en MC de



0,70±0,05 et un ds en B de 0,30±0,03, avec un rendement supérieur à 80 % ; et on obtient , à l'étape c), un rendement supérieur ou égal à 60 %.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, à l'étape a), le rapport eau:alcool est compris entre 10:90 (v/v) et 25:75 (v/v), et est de  
5 préférence de 15:85 (v/v).

En variante, le procédé de préparation (procédé 2) des dérivés de dextrane de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , telle que définie ci-dessus, dans laquelle  $a = 0$  ou  $a \neq 0$ ,  $b$  est différent de 0 et  $d = 0$ , comprend les étapes suivantes :

a) préparation de N-méthyl phényl 2-chloroacétamide par mise en  
10 contact de benzylamine avec du chlorure de chloroacétyle, puis isolement et purification du produit,

b) mise en contact de dextrane en solution hydro-alcoolique basique avec successivement la N-méthyl phényl 2-chloroacétamide en solution alcoolique obtenu en a) en présence ou non d'acide monochloroacétique en solution alcoolique,  
15 maintien du mélange obtenu à une température supérieure à 40°C, de préférence à 60°C, puis isolement et éventuellement purification du DB ou du DMCB obtenu, et

c) sulfatation du produit obtenu en b) comprenant (i) la formation d'un sel de trialkylammonium, (ii) la solubilisation du sel obtenu dans un solvant polaire anhydre, généralement une base de LEWIS, telle que le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou la diméthylformamide (DMF), (iii) l'ajout audit sel en solution, d'un  
20 complexe à base de trioxyde de soufre tel que  $SO_3$ -pyridine,  $SO_3$ -triéthylamine ou  $SO_3$ -DMF en solution dans le même solvant, à température inférieure à 70°C, le rapport molaire complexe à base de trioxyde de soufre/OH libres étant compris entre 0,25 et 12 et (iv) l'isolement et éventuellement la purification du DBSu ou DMCBSu obtenu.

25 La présence des étapes b) et c) ci-dessus permet d'obtenir la même homogénéité du produit final que celle obtenue avec le procédé 1 ci-dessus.

Pour préparer des dérivés de dextrane de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , telle que définie ci-dessus, dans laquelle  $a$  est différent de 0,  $b = 0$  et  $d = 0$  ( $\rightarrow DMC Su$ ) (procédé 3), ledit procédé est caractérisé en ce qu'il comprend les  
30 étapes suivantes :

a) **carboxyméthylation** d'un dextrane non substitué, dans les conditions exposées ci-dessus et

b) **sulfatation** du DMC obtenu en a) dans les conditions exposées ci-dessus.

5                    Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

                    - la figure 1 illustre schématiquement la structure d'un dextrane  
10 substitué par les différents groupements chimiques fixés sur les unités glucosidiques ; la position du substituant sur les différentes carbones des unités de base glucosidiques est présentée en 2, à titre d'exemple ;

                    - la figure 2 illustre le chromatogramme d'exclusion stérique haute performance obtenu avec un dérivé de dextrane tel que défini ci-dessus (DMCBSu);

15                    - la figure 3 illustre le chromatogramme d'échange d'ions obtenu avec un dérivé de dextrane tel que défini ci-dessus (DMCBSu).

                    Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

20    **EXEMPLE 1 : Caractérisations physico-chimiques des produits obtenus.**

                    \* **Dosage acide-base**

                    Le dosage acidimétrique donne une estimation du nombre de milliéquivalents de groupements carboxyméthyles et permet d'établir la composition des produits finaux.

25                    \* **Protocole**

                    Un étalonnage titrant permet de déterminer la molarité de la soude à l'aide d'un standard : le monohydrogénophthalate de potassium.

                    Entre 15 et 25 mg de produit purifié, séché (sous vide à 40°C) et pesé très précisément sont dissous dans un mélange eau-acétone (v:v, 50:50), de façon  
30 à avoir une solution de concentration finale d'environ 0,25 mg/ml.

                    Le pH apparent, alors compris entre 7 et 8, est abaissé entre 2,8 et 3, à l'aide d'une solution de HNO<sub>3</sub> 10 %. L'addition de la solution titrante est effectuée

par une microburette automatique de précision d'un volume total de 5 ml. Sur chaque produit au moins 3 dosages sont réalisés et le résultat exprimé en milliéquivalents de fonctions carboxyméthyles par gramme de polymère permet de calculer le taux de substitution en groupements carboxyméthyles. Cette méthode permet aussi par différence du nombre de milliéquivalents de fonctions carboxyméthyles avant et après benzylamidification d'estimer le taux de substitution en motif B. Pour l'ensemble des produits, les compositions ont été établies à l'aide de l'analyse élémentaire.

**\* L'analyse élémentaire de l'azote, du soufre et du chlore**

Le dosage de l'azote et du soufre par analyse élémentaire, exprimé en gramme d'élément pour 100 g de produit permet de déterminer respectivement le pourcentage de substitution des groupements Benzylamide (B), Sulfonate (S) et Sulfate (Su).

Le dosage du chlore permet de vérifier le degré de pureté des échantillons, le pourcentage de sel (NaCl) ne doit pas excéder 1 à 2 % au terme de la purification.

**\* Désulfatation des produits (DCMBSuS)**

Le produit sous forme de sel de sodium (250 mg, 10 ml) est agité lentement à température ambiante avec 3 ml de résine échangeuse de cations : Amberlite IR120 H<sup>+</sup>, 16-45 mesh, capacité d'échange totale : 1,9 meq/ml. Après 2 h, la solution acide est filtrée, neutralisée avec la pyridine (1 à 2 mL) jusqu'à un pH de 6-6,5 et évaporée à sec. Le sel de pyridinium obtenu est repris 3 fois avec 10 ml de méthanol anhydre et évaporé à sec.

Le résidu est dispersé dans 25 ml d'un mélange avec les proportions « 90:9:1 » en diméthylsulfoxyde (DMSO), méthanol et pyridine. La solution est mise à agiter dans un bain d'huile chauffé à 90°C pendant 72 h. La réaction est arrêtée en ajoutant 20 ml d'eau bidistillée froide, puis le mélange est neutralisé avec une solution aqueuse de NaOH 1M. Le produit désulfaté est purifié par chromatographie d'exclusion stérique basse pression sur une colonne Sephadex G15 puis diafiltré sur cellule équipée d'une membrane de seuil de coupure 1000 Da. Entre 160 et 210 mg de produit désulfaté sont obtenus.

### \* Détermination de la masse molaire

La masse molaire des produits préparés est déterminée par chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC). Trois systèmes de colonnes ont été utilisés :

- 5                   - deux colonnes montées en série (Si300 diol et Hema Sec Bio 40) couvrant un domaine de fractionnement compris entre  $10^6$  et 5 000 g/mol,
- une colonne Zorbax GF450 (domaine d'exclusion : 450 000 - 20 000 g/mol),
- une colonne TSK gel G2000 (domaine d'exclusion : 40 000 - 10   1 000 g/mol).

Elles sont étalonnées avec un kit de pullulanes (853 000 à 5 800 g/mol) ; le dextrane enzymatique (oligosaccharide, 1 500 g/mol) ; le mélezitose (trisaccharide, 522 g/mol) ; le sucrose (disaccharide, 342 g/mol) et le glucose (monosaccharide, 180 g/mol). Les échantillons à analyser sont préparés (à 2 mg/mL) et  
 15 élués avec une solution NaCl 0,15 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,05 M tamponnée à pH 7,3. Après filtration sur filtre de porosité 0,2  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{l}$  de l'échantillon sont injectés, le débit est réglé par une pompe Waters modèle 510 et la détection à la sortie de colonne se fait par réfractométrie différentielle. Les chromatogrammes traités par le logiciel d'analyse GPC Chromstar permettent de déterminer la masse molaire chromatographique ( $M_c$ ),  
 20 les masses molaires moyennes en poids ( $\overline{M}_p$ ) et en nombre ( $\overline{M}_n$ ) ainsi que l'indice de polymolécularité des produits.

### \* Spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier (FTIR)

1 mg de produit à analyser est mélangé à une solution de 150 mg de KBr dans 1 ml d'eau bidistillée. L'ensemble est filtré sur filtre de porosité 0,45  $\mu\text{m}$ ,  
 25 congelé et lyophilisé ; une pastille est préparée avec la poudre obtenue et le spectre est aussitôt enregistré. L'appareil est un spectrophotomètre FTIR (Perkin Elmer modèle 1600) et les spectres sont traités sur ordinateur avec le logiciel IRDM (Perkin Elmer).

### EXEMPLE 2 : Préparation de différents DMCBSu avec $b = 0$ ou $b \neq 0$ .

Le Tableau I suivant présente les différents dérivés obtenus et leurs  
 30 propriétés établies après analyse du produit final.

TABLEAU I

Produits	Conditions de synthèse	Composition			Masse molaire (g/mole)	Propriété biologique majeure
		Degré de substitution $\pm 10 \%$				
		MC	B	Su		
DMCBSu1	a	0,75	0,20	0,15	48 000	SP
DMCBSu2	b	0,80	0,25	0,15	70 000	SP
DMCBSu3	c	1,10	0,40	0,40	59 000	C
DMCBSu4	d	0,70	0,30	0,25	48 000	SP
DMCBSu5	e	0,80	0,35	0,15	56 000	MP
DMCBSu6	f	0,60	0,50	0,30	63 000	MP
DMCBSu7	g	0,70	0,30	0,16	70 000	MP
DMCBSu8	h	0,70	0,20	0,35	67 000	SP
DMCSu	i	1,00	0	0,37	70 000	AC

SP = substitut du plasma, C = cicatrisant, AC = anti-coagulant, MP = modulateur de la prolifération cellulaire.

5

#### a) DMCBSu1

##### Carboxyméthylation

Dans un réacteur double enveloppe de 2 l maintenu à température ambiante et muni d'un système d'agitation, on disperse 50 g (0,31 mole) de dextrane T40 de masse molaire de 40 000 environ dans 612 ml d'isopropanol.

10

Dans un bécher de 500 ml, on dissout 67,9 g (1,7 moles) de NaOH dans 188 ml d'eau bidistillée. La solution obtenue est refroidie à 4°C et ajoutée lentement au mélange dextrane-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

15

Dans un bécher de 1 l, on dissout 72,9 g (0,77 mole) d'acide monochloroacétique dans 450 ml d'isopropanol (rapport molaire acide/OH=2,5).

La solution d'acide monochloroacétique est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C à l'aide d'un thermostat relié au réacteur. L'ensemble est maintenu à cette température, sous agitation, pendant 1h30.

20

La phase aqueuse est ensuite récupérée et diluée jusqu'à obtenir un volume de 2,5 l. La solution ainsi obtenue est purifiée à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, avec de l'eau bidistillée jusqu'à obtenir une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de la solution est de 28 g/l. 20 ml de cette solution sont congelés et lyophilisés pour les analyses.

On obtient 70 g (0,289 mole) de DMC avec un degré de substitution en MC de  $1,0 \pm 0,1$ .

#### Benzylamidification

Le pH de la solution précédente est ajusté à 4,75. Le mélange est  
5 refroidi à 4°C. On y ajoute rapidement 62,3 g d'agent de couplage (CMC) (rapport molaire CMC/CM=0,5). Dès que l'agent de couplage est entièrement solubilisé dans le mélange, on ajoute rapidement 16 ml de benzylamine (rapport molaire benzylamine/CM=0,5). Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant 16 heures à la température ambiante.

10 Le mélange est ensuite ultrafiltré à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, successivement avec 15 l d'eau osmosée jusqu'à pH 7, puis avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6, et enfin avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de cette solution est de 21 g/l (3 l). 20 ml de cette solution concentrée sont congelés et  
15 lyophilisés pour les analyses. Les degrés de substitution en MC et en B sont respectivement  $0,79 \pm 0,07$  et  $0,22 \pm 0,03$ .

#### Sulfatation

La sulfatation nécessite la préparation du sel de triéthylammonium de DMCB.

20 La solution obtenue précédemment est éluée à travers une colonne de résine échangeuse de cation IR 120 H<sup>+</sup> (1,5 l). La solution ainsi acidifiée est neutralisée avec de la triéthylamine jusqu'à un pH proche de 7,0.

La solution neutralisée est concentrée et lyophilisée. Environ 65 g de sel de triéthylammonium sont obtenus.

25 Les 65 g (0,39 mole de OH libre) de sel obtenus sont séchés dans une étuve sous vide à 40°C pendant 5 h ainsi que tout le matériel nécessaire. Puis on les dissout, dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon, dans 1,7 l de DMSO préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å. 24,5 g (0,154 mole) (rapport molaire complexe/OH libre=0,4) de complexe SO<sub>3</sub>-pyridine sont  
30 dissous dans 300 ml de DMSO et ajoutés lentement à la solution de sel de triéthylammonium de DMCB. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 2 h à la tempéra-

ture ambiante et sous argon.

La réaction est arrêtée en ajoutant 2 l d'eau bidistillée à 4°C au mélange et on ramène le pH du milieu à 7,5-8 à l'aide d'une solution de NaOH 2M. La solution est ensuite diluée jusqu'à obtenir une concentration en DMSO de 0,5 % en volume et ultrafiltrée à volume constant avec de l'eau bidistillée sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole. La solution est alors concentrée jusqu'à un volume de 5 l et ultrafiltrée à volume constant sur la même membrane successivement avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 et avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La solution ainsi purifiée est concentrée au septième de son volume, congelée et lyophilisée. 60 g de DMCBSu1 sont ainsi obtenus. L'analyse élémentaire du soufre donne un ds en groupements sulfates de  $0,15 \pm 0,02$ .

#### b) DMCBSu2

##### Carboxyméthylation

Dans un réacteur double enveloppe de 2 l maintenu à température ambiante et muni d'un système d'agitation, on disperse 50 g (0,31 mole) de dextrane T40 de masse molaire de 40 000 environ dans 612 ml d'isopropanol.

Dans un bécher de 500 ml, on dissout 67,9 g (1,7 moles) de NaOH dans 188 ml. La solution obtenue est refroidie à 4°C et ajoutée lentement au mélange dextrane-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

Dans un bécher de 1 l, on dissout 87,5 g (0,93 mole) d'acide monochloroacétique dans 450 ml d'isopropanol (rapport molaire acide/OH=3).

La solution d'acide monochloroacétique est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C à l'aide d'un thermostat relié au réacteur. L'ensemble est maintenu à cette température, sous agitation, pendant 2 h.

La phase aqueuse est ensuite récupérée et diluée jusqu'à obtenir un volume de 2,5 l. La solution ainsi obtenue est purifiée à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, avec de l'eau bidistillée jusqu'à obtenir une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de la solution est de 28 g/l. 20 ml de cette solution est congelée et lyophilisée pour les analyses.

On obtient 70 g (0,28 mole) de DMC avec un degré de substitution

en MC de  $1,1 \pm 0,1$ .

#### Benzylamidification

Le pH de la solution précédente est ajusté à 4,75. Le mélange est refroidi à 4°C. On y ajoute rapidement 85,7 g d'agent de couplage (CMC) (rapport molaire CMC/CM=0,7). Dès que l'agent de couplage est entièrement solubilisé dans le mélange, on ajoute rapidement 22,2 ml de benzylamine (rapport molaire benzylamine/CM=0,7). Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant 16 heures à la température ambiante.

Le mélange est ensuite ultrafiltré à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, successivement avec 15 l d'eau osmosée jusqu'à pH 7, puis avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6, et enfin avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de cette solution est de 21 g/l (3 l). 20 ml de cette solution concentrée sont congelés et lyophilisés pour les analyses. Les degrés de substitution en MC et en B sont respectivement  $0,85 \pm 0,07$  et  $0,27 \pm 0,03$ .

#### Sulfatation

La solution obtenue précédemment est éluée à travers une colonne de résine échangeuse de cation IR 120 H<sup>+</sup> (1,5 l). La solution ainsi acidifiée est neutralisée avec de la triéthylamine jusqu'à un pH proche de 7.

La solution neutralisée est concentrée et lyophilisée. Environ 65 g de sel de triéthylammonium sont obtenus.

Les 65 g (0,365 mole de OH libre) de sel obtenus sont séchés dans une étuve sous vide à 40°C pendant 5 h ainsi que tout le matériel nécessaire. Puis on les dissout, dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon, dans 1,7 l de DMSO préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å. 22,9 g (0,144 mole) (rapport molaire complexe/OH libre=0,4) de complexe SO<sub>3</sub>-pyridine sont dissous dans 300 ml de DMSO et ajoutés lentement à la solution de polymère. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 2 h à la température ambiante et sous argon.

La réaction est arrêtée en ajoutant 2 l d'eau bidistillée à 4°C au mélange et on ramène le pH du milieu à 7,5-8 à l'aide d'une solution de NaOH 2M. La



solution est ensuite diluée jusqu'à obtenir une concentration en DMSO de 0,5 % en volume et ultrafiltrée à volume constant avec de l'eau bidistillée sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole. La solution est alors concentrée jusqu'à un volume de 5 l et ultrafiltrée à volume constant sur la même membrane successivement avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 et avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La solution ainsi purifiée est concentrée au septième de son volume, congelée et lyophilisée. 60 g de DMCBSu2 sont ainsi obtenus avec un degré de substitution en groupements Su de  $0,15 \pm 0,02$ .

c) DMCBSu3

10

Carboxyméthylation

Dans un réacteur double enveloppe de 2 l maintenu à température ambiante et muni d'un système d'agitation, on disperse 50 g (0,31 mole) de dextrane T40 de masse molaire de 40 000 environ dans 612 ml d'isopropanol.

Dans un bécher de 500 ml, on dissout 67,9 g (1,7 moles) de NaOH dans 188 ml. La solution obtenue est refroidie à 4°C et ajoutée lentement au mélange dextrane-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

Dans un bécher de 1 l, on dissout 72,9 g (0,77 mole) d'acide monochloroacétique dans 450 ml d'isopropanol (rapport molaire acide/OH=2,5).

La solution d'acide monochloroacétique est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C à l'aide d'un thermostat relié au réacteur. L'ensemble est maintenu à cette température, sous agitation, pendant 2 h.

La phase aqueuse est ensuite récupérée et purifiée :

- soit par une double précipitation dans 3 l de méthanol. Le précipité ainsi récupéré est lavé deux fois au méthanol et séché dans une étuve sous vide à 40°C,  
- soit par filtration tangentielle sur une membrane de seuil de coupure de 5 000 daltons.

La solution purifiée est alors concentrée et lyophilisée. On obtient 70 g (0,289 mole) de DMC avec un degré de substitution en MC de  $1,0 \pm 0,1$ .

### Recarboxyméthylation du DMC

Dans un réacteur double enveloppe de 3 l maintenu à température ambiante et muni d'un système d'agitation, on disperse les 70 g (0,289 mole ou 0,578 mole de OH libre) de DMC obtenus dans 1035 ml d'isopropanol.

5 Dans un bécher de 500 ml, on dissout 46,4 g (1,16 moles) de NaOH dans 265 ml. La solution obtenue est refroidie à 4°C et ajoutée lentement au mélange dextrans-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

Dans un bécher de 1 l, on dissout 54,6 g (0,578 mole) d'acide monochloroacétique dans 450 ml d'isopropanol (rapport molaire acide/OH libre=1).

10 La solution d'acide monochloroacétique est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C à l'aide d'un thermostat relié au réacteur. L'ensemble est maintenu à cette température, sous agitation, pendant 2 h.

La phase aqueuse est ensuite récupérée et diluée jusqu'à obtenir un  
15 volume de 2,5 l. La solution ainsi obtenue est purifiée à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, avec de l'eau bidistillée jusqu'à obtenir une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de la solution est de 30 g/l. 20 ml de cette solution est congelée et lyophilisée pour les analyses.

On obtient 75 g (0,26 mole) de DMC avec un degré de substitution  
20 en MC de  $1,58 \pm 0,12$ .

### Benzylamidification

Le pH de la solution précédente est ajusté à 4,75. On y ajoute rapidement 169 g d'agent de couplage (CMC) (rapport molaire CMC/CM=1). Dès que l'agent de couplage est entièrement solubilisé dans le mélange, on ajoute rapidement  
25 43,7 ml de benzylamine (rapport molaire benzylamine/CM=1). Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant 16 heures à la température ambiante.

Le mélange est ensuite ultrafiltré à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, successivement avec 15 l d'eau osmosée jusqu'à pH 7, puis avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6, et enfin avec de  
30 l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de cette solution est de 22 g/l (3 l). 20 ml de cette solution sont congelés et lyophilisés

pour les analyses. Les degrés de substitution en MC et en B sont respectivement  $1,15 \pm 0,10$  et  $0,44 \pm 0,04$ .

#### Sulfatation

La solution obtenue précédemment est éluée à travers une colonne de  
5 résine échangeuse de cation IR 120 H<sup>+</sup> (1,5 l). La solution ainsi acidifiée est neutralisée avec de la triéthylamine jusqu'à un pH proche de 7.

La solution neutralisée est concentrée et lyophilisée. Environ 70 g de sel de triéthylammonium sont obtenus.

Les 70 g (0,24 mole de OH libre) de sel obtenus sont séchés dans une  
10 étuve sous vide à 40°C pendant 5 h ainsi que tout le matériel nécessaire. Puis on les dissout, dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon, dans 1,7 l de DMSO préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å. 30,7 g (0,193 mole) (rapport molaire complexe/OH libre=0,8) de complexe SO<sub>3</sub>-pyridine sont dissous dans 300 ml de DMSO et ajoutés lentement à la solution de polymère.  
15 L'ensemble est laissé sous agitation pendant 2 h à la température ambiante et sous argon.

La réaction est arrêtée en ajoutant 2 l d'eau bidistillée à 4°C au mélange et on ramène le pH du milieu à 7,5-8 à l'aide d'une solution de NaOH 2M. La solution est ensuite diluée jusqu'à obtenir une concentration en DMSO de 0,5 % en  
20 volume et ultrafiltrée à volume constant avec de l'eau bidistillée sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole. La solution est alors concentrée jusqu'à un volume de 5 l et ultrafiltrée à volume constant sur la même membrane successivement avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 et avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La solution ainsi purifiée est concentrée au septième de son  
25 volume, congelée et lyophilisée. 65 g de DMCBSu3 sont ainsi obtenus avec un degré de substitution en groupements sulfates de  $0,40 \pm 0,04$ .

#### d) DMCBSu4

##### Carboxyméthylation

Dans un réacteur double enveloppe de 2 l maintenu à température  
30 ambiante et muni d'un système d'agitation, on disperse 50 g (0,31 mole) de dextrane T40 de masse molaire de 40 000 environ dans 612 ml d'isopropanol.

Dans un bécher de 500 ml, on dissout 67,9 g (1,7 moles) de NaOH dans 188 ml. La solution obtenue est refroidie à 4°C et ajoutée lentement au mélange dextrane-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

Dans un bécher de 1 l, on dissout 72,9 g (0,77 mole) d'acide monochloroacétique dans 450 ml d'isopropanol (rapport molaire acide/OH=2,5).

La solution d'acide monochloroacétique est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C à l'aide d'un thermostat relié au réacteur. L'ensemble est maintenu à cette température, sous agitation, pendant 2 h.

La phase aqueuse est ensuite récupérée et diluée jusqu'à obtenir un volume de 2,5 l. La solution ainsi obtenue est purifiée à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, avec de l'eau bidistillée jusqu'à obtenir une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de la solution est de 28 g/l. 20 ml de cette solution est congelée et lyophilisée pour les analyses.

On obtient 70 g (0,284 mole) de DMC avec un degré de substitution en MC de  $1,05 \pm 0,10$ .

#### Benzylamidification

Le pH de la solution précédente est ajusté à 4,75. On y ajoute rapidement 126,5 g d'agent de couplage (CMC) (rapport molaire CMC/CM=0,8). Dès que l'agent de couplage est entièrement solubilisé dans le mélange, on ajoute rapidement 32,6 ml de benzylamine (rapport molaire benzylamine/CM=0,8). Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant 16 heures à la température ambiante.

Le mélange est ensuite ultrafiltré à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, successivement avec 15 l d'eau osmosée jusqu'à pH 7, puis avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6, et enfin avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de cette solution est de 21 g/l (3 l). 20 ml de cette solution sont congelés et lyophilisés pour les analyses. Les degrés de substitution en MC et en B sont respectivement  $0,74 \pm 0,06$  et  $0,33 \pm 0,03$ .

#### Sulfatation

La solution obtenue précédemment est éluée à travers une colonne de

résine échangeuse de cation IR 120 H<sup>+</sup> (1,5 l). La solution ainsi acidifiée est neutralisée avec de la triéthylamine jusqu'à un pH proche de 7,0.

La solution neutralisée est concentrée et lyophilisée. Environ 65 g de sel de triéthylammonium sont obtenus.

5 Les 65 g (0,38 mole de OH libre) de sel obtenus sont séchés dans une étuve sous vide à 40°C pendant 5 h ainsi que tout le matériel nécessaire. Puis on les dissout, dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon, dans 1,7 l de DMSO préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å. 30,2 g (0,154 mole) (rapport molaire complexe/OH libre=0,5) de complexe SO<sub>3</sub>-pyridine sont  
10 dissous dans 300 ml de DMSO et ajoutés lentement à la solution de polymère. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 2 h à la température ambiante et sous argon.

La réaction est arrêtée en ajoutant 2 l d'eau bidistillée à 4°C au mélange et on ramène le pH du milieu à 7,5-8 à l'aide d'une solution de NaOH 2M. La  
15 solution est ensuite diluée jusqu'à obtenir une concentration en DMSO de 0,5 % en volume et ultrafiltrée à volume constant avec de l'eau bidistillée sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole. La solution est alors concentrée jusqu'à un volume de 5 l et ultrafiltrée à volume constant sur la même membrane successivement avec 10 l de  
20 tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 et avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La solution ainsi purifiée est concentrée au septième de son volume, congelée et lyophilisée. 60 g de DMCBSu4 sont ainsi obtenus avec un degré de substitution en groupements Su de  $0,25 \pm 0,03$ .

#### e) DMCBSu5

##### Carboxyméthylation

25 Dans un réacteur double enveloppe de 2 l maintenu à température ambiante et muni d'un système d'agitation, on disperse 50 g (0,31 mole) de dextrane T40 de masse molaire de 40 000 environ dans 612 ml d'isopropanol.

Dans un bécher de 500 ml, on dissout 67,9 g (1,7 moles) de NaOH dans 188 ml. La solution obtenue est refroidie à 4°C et ajoutée lentement au mélange  
30 dextrane-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

Dans un bécher de 1 l, on dissout 117,2 g (1,24 mole) d'acide mono-

chloroacétique dans 450 ml d'isopropanol (rapport molaire acide/OH=4).

La solution d'acide monochloroacétique est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C à l'aide d'un thermostat relié au réacteur. L'ensemble est maintenu à cette température, sous agitation, pendant  
5 2 h.

La phase aqueuse est ensuite récupérée et diluée jusqu'à obtenir un volume de 2,5 l. La solution ainsi obtenue est purifiée à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, avec de l'eau bidistillée jusqu'à obtenir une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de la solution est de 28 g/l. 20 ml de cette solution est congelée et lyophilisée pour les analyses.

On obtient 70 g (0,271 mole) de DMC avec un degré de substitution en MC de  $1,2 \pm 0,11$ .

#### Benzylamidification

Le pH de la solution précédente est ajusté à 4,75. On y ajoute rapidement 124,1 g d'agent de couplage (CMC) (rapport molaire CMC/CM=0,9). Dès que  
15 l'agent de couplage est entièrement solubilisé dans le mélange, on ajoute rapidement 35,5 ml de benzylamine (rapport molaire benzylamine/CM=0,9). Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant 16 heures à la température ambiante.

Le mélange est ensuite ultrafiltré à volume constant sur une  
20 membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, successivement avec 15 l d'eau osmosée jusqu'à pH 7, puis avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6, et enfin avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de cette solution est de 21 g/l (3 l). 20 ml de cette solution sont congelés et lyophilisés pour les analyses. Les degrés de substitution en MC et en B sont respectivement 0,84 ±  
25 0,07 et  $0,38 \pm 0,04$ .

#### Sulfatation

La solution obtenue précédemment est éluée à travers une colonne de résine échangeuse de cation IR 120 H<sup>+</sup> (1,5 l). La solution ainsi acidifiée est neutralisée avec de la triéthylamine jusqu'à un pH proche de 7.

La solution neutralisée est concentrée et lyophilisée. Environ 67 g de  
30 sel de triéthylammonium sont obtenus.

Les 67 g (0,33 mole de OH libre) de sel obtenus sont séchés dans une étuve sous vide à 40°C pendant 5 h ainsi que tout le matériel nécessaire. Puis on les dissout, dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon, dans 1,7 l de DMSO préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å. 21 g (0,132 mole) (rapport molaire complexe/OH libre=0,4) de complexe SO<sub>3</sub>-pyridine sont dissous dans 300 ml de DMSO et ajoutés lentement à la solution de polymère. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 2 h à la température ambiante et sous argon.

La réaction est arrêtée en ajoutant 2 l d'eau bidistillée à 4°C au mélange et on ramène le pH du milieu à 7,5-8 à l'aide d'une solution de NaOH 2M. La solution est ensuite diluée jusqu'à obtenir une concentration en DMSO de 0,5 % en volume et ultrafiltrée à volume constant avec de l'eau bidistillée sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole. La solution est alors concentrée jusqu'à un volume de 5 l et ultrafiltrée à volume constant sur la même membrane successivement avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 et avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La solution ainsi purifiée est concentrée au septième de son volume, congelée et lyophilisée. 62 g de DMCBSu5 sont ainsi obtenus avec un degré de substitution en groupements sulfates de  $0,15 \pm 0,02$ .

#### f) DMCBSu6

##### 20 Carboxyméthylation

Dans un réacteur double enveloppe de 2 l maintenu à température ambiante et muni d'un système d'agitation, on disperse 50 g (0,31 mole) de dextrane T40 de masse molaire de 40 000 environ dans 612 ml d'isopropanol.

Dans un bécher de 500 ml, on dissout 67,9 g (1,7 moles) de NaOH dans 188 ml. La solution obtenue est refroidie à 4°C et ajoutée lentement au mélange dextrane-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

Dans un bécher de 1 l, on dissout 87,5 g (0,93 mole) d'acide monochloroacétique dans 450 ml d'isopropanol (rapport molaire acide/OH=3).

La solution d'acide monochloroacétique est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C à l'aide d'un thermostat relié au réacteur. L'ensemble est maintenu à cette température, sous agitation, pendant

2 h.

La phase aqueuse est ensuite récupérée et diluée jusqu'à obtenir un volume de 2,5 l. La solution ainsi obtenue est purifiée à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, avec de l'eau bidistillée jusqu'à obtenir  
5 une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de la solution est de 28 g/l. 20 ml de cette solution est congelée et lyophilisée pour les analyses.

On obtient 70 g (0,28 mole) de DMC avec un degré de substitution en MC de  $1,1 \pm 0,10$ .

#### 1ère benzylamidification

10 Le pH de la solution précédente est ajusté à 4,75. On y ajoute rapidement 130,5 g d'agent de couplage (CMC) (rapport molaire CMC/CM=1). Dès que l'agent de couplage est entièrement solubilisé dans le mélange, on ajoute rapidement 30,3 ml de benzylamine (rapport molaire benzylamine/CM=0,9). Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant 16 heures à la température ambiante.

15 Le mélange est ensuite ultrafiltré à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, successivement avec 15 l d'eau osmosée jusqu'à pH 7, puis avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6, et enfin avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La solution est concentrée jusqu'à un volume de 2,5 l (~28 g/l ou 0,1 mole/l). 20 ml de cette solution sont  
20 congelés et lyophilisés pour les analyses. Les degrés de substitution en MC et en B sont respectivement  $0,75 \pm 0,06$  et  $0,38 \pm 0,04$ .

#### 2ème benzylamidification

Le pH des 2,5 l de solution de DMCB précédente est réajusté à 4,75. Le mélange est refroidi à 4°C. On y ajoute rapidement 40 g d'agent de couplage  
25 (CMC) (rapport molaire CMC/CM=0,5). Dès que l'agent de couplage est entièrement solubilisé dans le mélange, on ajoute rapidement 10,3 ml de benzylamine (rapport molaire benzylamine/CM=0,5). Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant 16 heures à la température ambiante.

Le mélange est ensuite ultrafiltré à volume constant sur une  
30 membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, successivement avec 15 l d'eau osmosée jusqu'à pH 7, puis avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6, et enfin avec de



l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de cette solution es de 21 g/l (3 l). 20 ml de cette solution sont congelés et lyophilisés pour les analyses. Les degrés de substitution en MC et en B sont respectivement  $0,65 \pm 0,06$  et  $0,54 \pm 0,05$ .

5

#### Sulfatation

La solution obtenue précédemment est éluée à travers une colonne de résine échangeuse de cation IR 120 H<sup>+</sup> (1,5 l). La solution ainsi acidifiée est neutralisée avec de la triéthylamine jusqu'à un pH proche de 7.

La solution neutralisée est concentrée et lyophilisée. Environ 65 g de  
10 sel de triéthylammonium sont obtenus.

Les 65 g (0,365 mole de OH libre) de sel obtenus sont séchés dans une étuve sous vide à 40°C pendant 5 h ainsi que tout le matériel nécessaire. Puis on les dissout, dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon, dans 1,7 l de DMSO préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å. 34,9  
15 g (0,219 mole) (rapport molaire complexe/OH libre=0,6) de complexe SO<sub>3</sub>-pyridine sont dissous dans 300 ml de DMSO et ajoutés lentement à la solution de polymère. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 2 h à la température ambiante et sous argon.

La réaction est arrêtée en ajoutant 2 l d'eau bidistillée à 4°C au  
20 mélange et on ramène le pH du milieu à 7,5-8 à l'aide d'une solution de NaOH 2M. La solution est ensuite diluée jusqu'à obtenir une concentration en DMSO de 0,5 % en volume et ultrafiltrée à volume constant avec de l'eau bidistillée sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole. La solution est alors concentrée jusqu'à un volume de 5 l et ultrafiltrée à volume constant sur la même membrane successivement avec 10 l de  
25 tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 et avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La solution ainsi purifiée est concentrée au septième de son volume, congelée et lyophilisée. 60 g de DMCBSu6 sont ainsi obtenus avec un degré de substitution en groupements sulfates de  $0,30 \pm 0,03$ .

#### g) DMCBSu7

30

#### Carboxyméthylation

Dans un réacteur double enveloppe de 2 l maintenu à température

ambiante et muni d'un système d'agitation, on disperse 50 g (0,31 mole) de dextrane T40 de masse molaire de 40 000 environ dans 612 ml d'isopropanol.

Dans un bécher de 500 ml, on dissout 67,9 g (1,7 moles) de NaOH dans 188 ml. La solution obtenue est refroidie à 4°C et ajoutée lentement au mélange dextrane-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

Dans un bécher de 1 l, on dissout 72,9 g (0,77 mole) d'acide monochloroacétique dans 450 ml d'isopropanol (rapport molaire acide/OH=2,5).

La solution d'acide monochloroacétique est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C à l'aide d'un thermostat relié au réacteur. L'ensemble est maintenu à cette température, sous agitation, pendant 2 h.

La phase aqueuse est ensuite récupérée et diluée jusqu'à obtenir un volume de 2,5 l. La solution ainsi obtenue est purifiée à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, avec de l'eau bidistillée jusqu'à obtenir une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de la solution est de 28 g/l. 20 ml de cette solution est congelée et lyophilisée pour les analyses.

On obtient 70 g (0,284 mole) de DMC avec un degré de substitution en MC de 1,05.

#### Benzylamidification

Le pH de la solution précédente est ajusté à 4,75. On y ajoute rapidement 126,5 g d'agent de couplage (CMC) (rapport molaire CMC/CM=0,8). Dès que l'agent de couplage est entièrement solubilisé dans le mélange, on ajoute rapidement 32,6 ml de benzylamine (rapport molaire benzylamine/CM=0,8). Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant 16 heures à la température ambiante.

Le mélange est ensuite ultrafiltré à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, successivement avec 15 l d'eau osmosée jusqu'à pH 7, puis avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6, et enfin avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de cette solution est de 21 g/l (3 l). 20 ml de cette solution sont congelés et lyophilisés pour les analyses. Les degrés de substitution en MC et en B sont respectivement 0,74 ± 0,06 et 0,33 ± 0,03.

### Sulfatation

La solution obtenue précédemment est éluée à travers une colonne de résine échangeuse de cation IR 120 H<sup>+</sup> (1,5 l). La solution ainsi acidifiée est neutralisée avec de la triéthylamine jusqu'à un pH proche de 7.

5 La solution neutralisée est concentrée et lyophilisée. Environ 65 g de sel de triéthylammonium sont obtenus.

Les 65 g (0,38 mole de OH libre) de sel obtenus sont séchés dans une étuve sous vide à 40°C pendant 5 h ainsi que tout le matériel nécessaire. Puis on les dissout, dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon, dans 1,7 l de DMSO préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å. 24,2 g (0,154 mole) (rapport molaire complexe/OH libre=0,4) de complexe SO<sub>3</sub>-pyridine sont dissous dans 300 ml de DMSO et ajoutés lentement à la solution de polymère. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 2 h à la température ambiante et sous argon.

15 La réaction est arrêtée en ajoutant 2 l d'eau bidistillée à 4°C au mélange et on ramène le pH du milieu à 7,5-8 à l'aide d'une solution de NaOH 2M. La solution est ensuite diluée jusqu'à obtenir une concentration en DMSO de 0,5 % en volume et ultrafiltrée à volume constant avec de l'eau bidistillée sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole. La solution est alors concentrée jusqu'à un volume de 5 l et ultrafiltrée à volume constant sur la même membrane successivement avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 et avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La solution ainsi purifiée est concentrée au septième de son volume, congelée et lyophilisée. 60 g de DMCBSu7 sont ainsi obtenus avec un degré de substitution en groupements sulfates de  $0,16 \pm 0,02$ .

25 h) DMCBSu8

### Carboxyméthylation

Dans un réacteur double enveloppe de 2 l maintenu à température ambiante et muni d'un système d'agitation, on disperse 50 g (0,31 mole) de dextrane T40 de masse molaire de 40 000 environ dans 612 ml d'isopropanol.

30 Dans un bécher de 500 ml, on dissout 67,9 g (1,7 moles) de NaOH dans 188 ml. La solution obtenue est refroidie à 4°C et ajoutée lentement au mélange

dextrane-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

Dans un bécher de 1 l, on dissout 72,9 g (0,77 mole) d'acide monochloroacétique dans 450 ml d'isopropanol (rapport molaire acide/OH=2,5).

La solution d'acide monochloroacétique est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C à l'aide d'un thermostat relié au réacteur. L'ensemble est maintenu à cette température, sous agitation, pendant 1 h.

La phase aqueuse est ensuite récupérée et diluée jusqu'à obtenir un volume de 2,5 l. La solution ainsi obtenue est purifiée à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, avec de l'eau bidistillée jusqu'à obtenir une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de la solution est de 28 g/l. 20 ml de cette solution est congelée et lyophilisée pour les analyses.

On obtient 70 g (0,295 mole) de DMC avec un degré de substitution en MC de  $0,94 \pm 0,10$ .

#### 15 Benzylamidification

Le pH de la solution précédente est ajusté à 4,75. Le mélange est refroidi à 4°C. On y ajoute rapidement 58,8 g d'agent de couplage (CMC) (rapport molaire CMC/CM=0,5). Dès que l'agent de couplage est entièrement solubilisé dans le mélange, on ajoute rapidement 15,2 ml de benzylamine (rapport molaire 20 benzylamine/CM=0,5). Le mélange est ensuite laissé sous agitation pendant 16 heures à la température ambiante.

Le mélange est ensuite ultrafiltré à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, successivement avec 15 l d'eau osmosée jusqu'à pH 7, puis avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6, et enfin avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de 25 cette solution est de 21 g/l (3 l). 5 ml de cette solution concentrée sont congelés et lyophilisés pour les analyses. Les degrés de substitution en MC et en B sont respectivement  $0,75 \pm 0,07$  et  $0,22 \pm 0,03$ .

#### Sulfatation

30 La solution obtenue précédemment est éluée à travers une colonne de résine échangeuse de cation IR 120 H<sup>+</sup> (1,5 l). La solution ainsi acidifiée est neutralisée

avec de la triéthylamine jusqu'à un pH proche de 7.

La solution neutralisée est concentrée et lyophilisée. Environ 65 g de sel de triéthylammonium sont obtenus.

Les 65 g (0,4 mole de OH libre) de sel obtenus sont séchés dans une  
5 étuve sous vide à 40°C pendant 5 h ainsi que tout le matériel nécessaire. Puis on les dissout, dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon, dans 1,7 l de DMSO préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å. 45,2 g (0,154 mole) (rapport molaire complexe/OH libre=0,7) de complexe SO<sub>3</sub>-pyridine sont dissous dans 300 ml de DMSO et ajoutés lentement à la solution de polymère.  
10 L'ensemble est laissé sous agitation pendant 2 h à la température ambiante et sous argon.

La réaction est arrêtée en ajoutant 2 l d'eau bidistillée à 4°C au mélange et on ramène le pH du milieu à 7,5-8 à l'aide d'une solution de NaOH 2M. La solution est ensuite diluée jusqu'à obtenir une concentration en DMSO de 0,5 % en  
15 volume et ultrafiltrée à volume constant avec de l'eau bidistillée sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole. La solution est alors concentrée jusqu'à un volume de 5 l et ultrafiltrée à volume constant sur la même membrane successivement avec 10 l de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 et avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La solution ainsi purifiée est concentrée au septième de son  
20 volume, congelée et lyophilisée. 60 g de DMCBSu8 sont ainsi obtenus avec un degré de substitution en groupements sulfates de  $0,35 \pm 0,04$ .

#### i) DMCSu

##### Carboxyméthylation

Dans un réacteur double enveloppe de 2 l maintenu à température  
25 ambiante et muni d'un système d'agitation, on disperse 50 g (0,31 mole) de dextrane T40 de masse molaire de 40 000 environ dans 612 ml d'isopropanol.

Dans un bécher de 500 ml, on dissout 67,9 g (1,7 moles) de NaOH dans 188 ml. La solution obtenue est refroidie à 4 C et ajoutée lentement au mélange dextrane-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

30 Dans un bécher de 1 l, on dissout 72,9 g (0,77 mole) d'acide mono-chloroacétique dans 450 ml d'isopropanol (rapport molaire acide/OH=2,5).

La solution d'acide monochloroacétique est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C à l'aide d'un thermostat relié au réacteur. L'ensemble est maintenu à cette température, sous agitation, pendant 2 h.

5 La phase aqueuse est ensuite récupérée et diluée jusqu'à obtenir un volume de 2,5 l. La solution ainsi obtenue est purifiée à volume constant sur une membrane de seuil de coupure 5 000 g/mole, avec de l'eau bidistillée jusqu'à obtenir une conductivité du filtrat satisfaisante. La concentration de la solution est de 28 g/l. 20 ml de cette solution sont congelés et lyophilisés pour les analyses.

10 On obtient 70 g (0,289 mole) de DMC avec un degré de substitution en MC de  $1,0 \pm 0,1$ .

#### Sulfatation

La solution obtenue précédemment est éluée à travers une colonne de résine échangeuse de cation IR 120 H<sup>+</sup> (1,5 l). La solution ainsi acidifiée est neutralisée  
15 avec de la triéthylamine jusqu'à un pH proche de 7.

La solution neutralisée est concentrée et lyophilisée. Environ 80 g de sel de triéthylammonium sont obtenus.

Les 80 g (0,466 mole de OH libre) de sel obtenus sont séchés dans une étuve sous vide à 40°C pendant 5 h ainsi que tout le matériel nécessaire. Puis on  
20 les dissout, dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon, dans 1,7 l de DMSO préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å. 52 g (0,326 mole) (rapport molaire complexe/OH libre=0,7) de complexe SO<sub>3</sub>-pyridine sont dissous dans 300 ml de DMSO et ajoutés lentement à la solution de polymère. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 2 h à la température ambiante et sous  
25 argon.

La réaction est arrêtée en ajoutant 2 l d'eau bidistillée à 4°C au mélange et on ramène le pH du milieu à 7,5-8 à l'aide d'une solution de NaOH 2M. La solution est ensuite diluée jusqu'à obtenir une concentration en DMSO de 0,5 % en volume et ultrafiltrée à volume constant avec de l'eau bidistillée sur une membrane de  
30 seuil de coupure 5 000 g/mole. La solution est alors concentrée jusqu'à un volume de 5 l et ultrafiltrée à volume constant sur la même membrane successivement avec 10 l de

tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 et avec de l'eau bidistillée jusqu'à une conductivité du filtrat satisfaisante. La solution ainsi purifiée est concentrée au septième de son volume, congelée et lyophilisée. 70 g de DMCSu sont ainsi obtenus. L'analyse élémentaire du soufre donne un ds en groupements sulfates de  $0,37 \pm 0,04$ .

5 **EXEMPLE 3 : Préparation d'un DMCBSuS.**

On prépare une suspension de 10 g du DMCBSu, obtenu conformément à l'exemple 2, dans 350 ml de dichlorométhane anhydre. On ajoute 0,62 ml d'acide chlorosulfonique dans 35 ml de dichlorométhane anhydre (rapport molaire acide chlorosulfonique/motifs B = 1). Le mélange est maintenu sous agitation et sous argon  
10 pendant 1 heure à température ambiante. Le produit est filtré sur fritté N°4, lavé successivement avec 200 ml de dichlorométhane, 200 ml de dichlorométhane/dioxanne 50:50 (v:v) et enfin avec du dioxanne pur.

Le DMCBSuS sous forme acide est aussitôt dissous dans 150 ml d'eau et le pH de la solution est ajusté à 9 avec NaOH 6 M et maintenu à cette valeur  
15 pendant 1 heure. La solution est alors neutralisée avec HCl 0,1 M, congelée et lyophilisée.

La quantité de sulfonates est établie par différence des taux de soufre des produits initial et final après désulfatation des deux, dans les conditions précisées à l'exemple 1.

20 **EXEMPLE 4 : Variante de procédé pour la préparation d'un DMCBSu.**

**a) Préparation du réactif N-méthyl phénvl 2 chloroacétamide**

Dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon (atmosphère inerte), on mélange 109,4 ml (1 mole) de benzylamine avec 1 l d'éther préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å.

25 On ajoute goutte à goutte, à l'aide d'une ampoule à brome, 79,7 ml (1 mole) de chlorure de chloroacétyle (durée d'introduction 30 minutes). Après ajout, le ballon est scellé et laissé sous agitation à température ambiante pendant 1 heure.

Le mélange est ensuite lavé, successivement avec 1,5 l de solution d'acide citrique 0,5 M (220 g), 1,5 l d'eau bidistillée à 4°C, 1,5 l de solution d'hydro-  
30 gène-carbonate de sodium 0,5 M (63 g) et 1,5 l de solution NaCl 1 M (87,8 g).

La phase étherée est récupérée et évaporée à sec.

Le résidu sec est purifié par une double recristallisation dans l'eau :

- On dissout le résidu dans de l'eau bidistillée, (solution de 1-2% p/v) portée à ébullition. On filtre cette solution bouillante à l'aide d'un verre fritté N°4 préchauffé à 100°C. La solution filtrée est refroidie et conservée à 4°C pendant une nuit.
- 5 Le réactif est ensuite récupéré sur du papier Wattman et séché dans une étuve sous vide à 50°C environ.

#### b) Synthèse de DMCB

- Dans un réacteur double enveloppe de 2 l muni d'un système d'agitation, on disperse 50 g (0,31 mole) de dextrane T40 de masse molaire de 40.000 environ dans 400 ml d'isopropanol.
- 10

Dans un bécher de 500 ml, on dissout 56,5 g (1,41 mole) de NaOH dans 225 ml. La solution obtenue est refroidie à 4°C et ajoutée lentement au mélange dextrane-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

- Dans un bécher de 1 l, on dissout 84,9 g (0,46 mole) du N-méthyl phényl 2 chloroacétamide obtenu en a), dans 675 ml d'isopropanol. Dans un autre bécher de 500 ml, on dissout 43,7 g (0,46 mole) d'acide monochloroacétique dans 200 ml d'isopropanol.
- 15

- La solution de N-méthyl phényl 2 chloro-acétamide est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C à l'aide d'un thermostat relié au réacteur. Environ 5 minutes plus tard, la solution d'acide monochloroacétique y est rapidement ajoutée et l'ensemble est maintenu à 60°C sous agitation pendant 2 heures.
- 20

La phase aqueuse est ensuite récupérée et purifiée :

- soit par une double précipitation dans 3 l de méthanol ; le précipité
- 25 ainsi récupéré est lavé deux fois au méthanol et séché dans une étuve sous vide à 40°C.
- soit par filtration tangentielle sur une membrane de seuil de coupure de 5.000 Daltons ; la solution purifiée est alors concentrée et lyophilisée.

La composition du DMC obtenu par cette méthode est la suivante :

MC =  $0,90 \pm 0,09$  et B =  $0,30 \pm 0,03$ .



**c) Synthèse du DMCBSu**

- mise sous forme de sel de tributylammonium (ou tri-éthylammonium)

5 50 g (0,18 mole) du DMCB obtenu à l'étape b) sont dissous dans 2 l d'eau bidistillée. La solution obtenue est éluée à travers une colonne de résine échangeuse de cations (Amberlite IR120 H<sup>+</sup>). Le produit ainsi acidifié est neutralisé avec de la tributylamine à 10 % dans l'éthanol (ou de la triéthylamine) jusqu'à un pH proche de 7.

La solution neutralisée est purifiée par filtration tangentielle sur une  
10 membrane de seuil de coupure 5.000 daltons, concentrée et lyophilisée. Environ 60 g de sel de tributylammonium (ou triéthylammonium) sont obtenus.

- **Sulfatation du DMCB de tributylammonium (ou tri-éthylammonium)**

Les 60 g de sel obtenus sont séchés dans une étuve sous vide à 40°C  
15 pendant 4 heures ainsi que tout le matériel nécessaire. Puis on les dissout, dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon, dans 2,7 l de N,N-diméthylformamide (DMF) préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å (5,7 l pour le sel de triéthylammonium). 38,7 g (0,24 mole) de complexe SO<sub>3</sub>-pyridine (46,6 g (0,29 mole) dans le cas du sel de triéthylammonium) sont dissous dans 300 ml  
20 de DMF et ajoutés lentement à la solution de polymère. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 2 heures à température ambiante.

La réaction est arrêtée en ajoutant 3 l d'eau bidistillée à 4°C au mélange et on ramène le pH du milieu à 7,5-8 à l'aide d'une solution de NaOH 2 M. La solution est ensuite ultrafiltrée sur membrane de seuil de coupure 5.000 daltons,  
25 concentrée et lyophilisée.

**EXEMPLE 5 : Synthèse du DMCSu.****a) Synthèse du DMC**

Dans un réacteur double enveloppe de 2 l muni d'un système d'agitation, on disperse 50 g (0,31 mole) de dextrane T40 de masse molaire de 40.000 environ dans 612 ml d'isopropanol.  
30

Dans un bécher de 500 ml, on dissout 67,9 g (1,7 mole) de NaOH dans 188 ml. La solution obtenue est refroidie à 4°C et ajoutée lentement au mélange

dextrane-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

Dans un bécher de 1 l, on dissout 72,9 g (0,77 mole) d'acide monochloroacétique dans 450 ml d'isopropanol.

La solution d'acide monochloroacétique est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C à l'aide d'un thermostat relié au réacteur. L'ensemble est maintenu à cette température, sous agitation, pendant 2 heures.

La phase aqueuse est ensuite récupérée et purifiée :

- soit par une double précipitation dans 3 l de méthanol ; le précipité ainsi récupéré est lavé deux fois au méthanol et séché dans une étuve sous vide à 40°C,
- soit par filtration tangentielle sur une membrane de seuil de coupure de 5.000 Daltons ; la solution purifiée est alors concentrée et lyophilisée.

#### **b) Synthèse du DMCSu**

- mise sous forme de sel de tributylammonium (ou tri-éthyl-ammonium)

50 g (0,18 mole) de DMC sont dissous dans 2 l d'eau bidistillée. La solution obtenue est éluée à travers une colonne de résine échangeuse de cations (Amberlite IR120 H<sup>+</sup>). Le produit ainsi acidifié est neutralisé avec de la tributylammonium à 10% dans l'éthanol (ou la triéthylamine) jusqu'à un pH proche de 7.

La solution neutralisée est purifiée par filtration tangentielle sur une membrane de seuil de coupure de 5.000 Daltons, concentrée et lyophilisée. Environ 60 g de sel de tributylammonium (ou triéthyl-ammonium) sont obtenus.

- sulfatation du DMC de tributylammonium (ou triéthyl-ammonium)

Les 60 g de sel obtenus sont séchés dans une étuve sous vide à 40°C pendant 4 heures ainsi que tout le matériel nécessaire. Puis on les dissout, dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon, dans 2,7 l de N,N-diméthylformamide (DMF) préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å. 44,8 g (0,28 mole) de complexe SO<sub>3</sub>-pyridine ou 55,8 g (0,35 mole) dans le cas du sel de triéthylammonium), sont dissous dans 300 ml de DMF et ajoutés lentement à la solution de polymère. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 2 heures à température ambiante et sous argon.

La réaction est arrêtée en ajoutant 3 l d'eau bidistillée à 4°C au mélange et le pH du milieu à 7,5-8 est ramené à l'aide d'une solution de NaOH 2 M. La solution est ensuite ultrafiltrée sur membrane de seuil de coupure 5.000 daltons, concentrée et lyophilisée.

- 5 La composition d'un DMCSu obtenu est la suivante :  $MC = 1 \pm 0,1$ ,  
 $Su = 0,37 \pm 0,04$ .

**EXEMPLE 6 : Synthèse d'un DBSu.**

**a) Synthèse du DB**

- 10 Dans un réacteur double enveloppe de 2 l, muni d'un système d'agitation, on disperse 50 g (0,31 mole) de dextrane T40 de masse molaire d'environ 40.000, dans 400 ml d'isopropanol.

Dans un bécher de 500 ml, on dissout 56,5 g (1,41 mole) de NaOH dans 225 ml. La solution obtenue est refroidie à 4°C et ajoutée lentement au mélange dextrane-isopropanol. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 1 heure.

- 15 Dans un bécher de 1 l, on dissout 84,9 g (0,46 mole) de N-méthyl phényl 2 chloroacétamide (voir Exemple 5) dans 875 ml d'isopropanol. La solution obtenue est ajoutée rapidement dans le réacteur double enveloppe et l'ensemble est porté à 60°C, à l'aide d'un thermostat relié au réacteur ; l'ensemble est maintenu à cette température sous agitation pendant 2 heures.

- 20 La phase aqueuse est ensuite récupérée et purifiée :

- soit par une double précipitation dans 3 l de méthanol ; le précipité ainsi récupéré est lavé deux fois au méthanol et séché dans une étuve sous vide à 40°C ;

- 25 - soit par filtration tangentielle sur une membrane de seuil de coupure de 5.000 Daltons ; la solution purifiée est alors concentrée et lyophilisée.

Environ 60 g de DB sont obtenus. La composition du produit est la suivante :

**b) Synthèse du DBSu**

- 30 Les 60 g de DB obtenus sont séchés dans une étuve sous vide à 40°C pendant 4 heures ainsi que tout le matériel nécessaire. Puis on disperse le produit, dans un ballon tricol muni d'un système d'agitation et de circulation d'argon, dans 2,7 l de

N,N-diméthylformamide (DMF) préalablement séché sur des tamis moléculaires 4 Å. 40,7 g (0,26 mole) de complexe SO<sub>3</sub>-pyridine sont dissous dans 300 ml de DMF et ajoutés lentement à la solution de polymère. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 2 heures à la température ambiante et sous argon.

5 La réaction est arrêtée en ajoutant 3 l d'eau bidistillée à 4°C au mélange et le pH du milieu est ramené à 7,5-8 à l'aide d'une solution de NaOH 2 M. La solution est ensuite ultrafiltrée sur membrane de seuil de coupure de 5.000 Daltons, concentrée et lyophilisée.

La composition d'un DBSu obtenu est la suivante : B =  $0,3 \pm 0,03$  et  
10 Su =  $0,14 \pm 0,02$ .

**EXEMPLE 7 : Activité anticoagulante et anticomplémentaire des produits selon l'invention.**

**a) Mesure de l'activité anticoagulante**

Le temps de céphaline activée est un test d'exploration sensible à  
15 tous les facteurs de la voie endogène (thrombine, V, VIII, IX, XI et XII) du système de la coagulation à l'exception du facteur III plaquettaire. Le réactif utilisé (APTT, Organon Teknika) contient des phospholipides de cerveau de lapin (facteur III plaquettaire) et un activateur particulière (silice micronisée ou acide ellagique). Le protocole utilisé est le suivant :

20 100 µL de plasma humain pauvre en plaquettes (PPP)  
100 µL de tampon Owren Koller (TOK)  
100 µL de réactif APTT  
incubation 3 min à 37°C  
100 µL de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) 25 mM  
25 mesure du temps d'apparition du caillot.

Une droite est tracée en portant le logarithme du temps de coagulation en fonction de la concentration du polymère. La pente de la droite permet de calculer l'activité anticoagulante spécifique du polysaccharide d'après l'équation :

$$a(\text{UI/mg}) = \frac{\text{pente de la droite DMCBSu}}{\text{pente de la droite héparine}} \times \frac{\text{activité anticoagulante spécifique de l'héparine étalon utilisée}}{1}$$

5                                    **b) Mesure de l'inhibition de l'activation du complément**

L'action de dérivés de dextrane de compositions chimiques variables a été étudiée dans un dosage hémolytique ou CH50, selon un protocole dans lequel le sérum humain est incubé avec l'un des dérivés du dextrane de l'invention pendant 30 minutes à 37°C avant d'être activé par des érythrocytes de mouton sensibilisés par des anticorps de lapin antiglobules rouges de mouton (EA). Par définition, une unité CH50 correspond à la concentration de protéines du complément (contenue dans un millilitre de sérum) capable d'induire l'hémolyse de 50% de  $2 \times 10^7$  EA activés dans un milieu réactionnel où sont maintenus constants le volume, la température et le temps de réaction. Le nombre de sites hémolytiques par cellule est calculé.

15                                    L'activité inhibitrice de l'activation du complément est exprimée en pourcentage d'inhibition de formation de convertase par référence au tube témoin où le nombre de sites hémolytiques est déterminé en l'absence de dérivé de dextrane.

Cette activité, A, est exprimée en poids de produit (à volume constant) (µg), nécessaire à 50% d'inhibition de formation de sites hémolytiques. Cette expression de l'activité anticomplémentaire signifie que celle-ci est inversement proportionnelle au poids de produit. En d'autres termes, l'activité anticomplémentaire est d'autant plus élevée que le poids de produit est plus faible.

Cette activité varie en fonction de la composition chimique globale du produit.

25                                    Les résultats obtenus avec 5 dérivés selon l'invention sont illustrés dans le Tableau II ci-après, qui rappelle leur composition chimique globale et leur activité anticoagulante spécifique, a, exprimée en unité internationale par mg de produit (par référence à l'héparine à 173 UI/mg).

TABLEAU II

Référence de l'échantillon	Composition chimique			Activité anti-complémentaire	Activité anti-coagulante
	MC	B	Su	A µg	a UI/mg
Dextrane	0	0	0	1250	0
Dextrane MC	1,0	0	0	570	0
DMCBSu1	0,75	0,20	0,15	150	0,02
DMCBSu2	0,80	0,25	0,15	150	0,04
DMCBSu3	1,10	0,40	0,40	35	4,0
DMCBSu4	0,70	0,30	0,25	125	0,08
DMCB1	0,80	0,10	0	300	0
Héparine	-	-	-	2700	173

On constate que l'activité anti-complémentaire croît en même temps que l'augmentation du ds en motifs MC et Su. Au delà d'un ds en motifs MC de l'ordre de 0,40, l'activité anticoagulante croît en même temps que l'augmentation du ds en motifs Su.

On observe que les dérivés de faible ds en motifs Su présentent déjà une activité anticomplémentaire importante alors que leur activité anticoagulante est très faible. On remarque enfin que la seule présence de motifs MC et B induit une légère activité anti-complémentaire alors qu'elle n'entraîne aucun effet anti-coagulant.

Ces résultats montrent qu'il est possible d'obtenir des produits dotés d'une forte activité d'inhibition de l'activation du complément et d'une activité anticoagulante spécifique très faible.

#### **EXEMPLE 8 : Activité antiproliférative des composés selon l'invention.**

Les composés DMCBSu ont des effets de stimulation ou d'inhibition de la croissance cellulaire, selon la nature des cellules. Ainsi, par exemple, dans le domaine cardio-vasculaire les produits présentent l'avantage de stimuler la croissance des cellules endothéliales et d'inhiber la croissance des cellules musculaires lisses (CML). Ces propriétés sont importantes en pharmacologie, leur intérêt majeur étant la prévention de la resténose après angioplastie ou interventions chirurgicales cardio-vasculaires.

L'activité antiproliférative des DMCBSu a été étudiée sur les cellules musculaires lisses de l'aorte de rat (CML).

24 heures après l'ensemencement des cellules dans un milieu à 10% de sérum de veau foetal (SVF), les cellules sont mises 3 jours en carence (milieu à

0,1% de SVF) (cela permet aux cellules de se synchroniser en les stoppant au stade GO/G1 du cycle cellulaire). Les cellules sont ensuite réalimentées par du milieu à 10% de SVF contenant également des concentrations variables du produit à tester (de 0 à 1 mg/ml). Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions mais sans ajout de produit.

5                    Au bout de 5 jours de croissance, les cellules sont comptées (à l'aide d'un compteur automatique ou par mesure de la radioactivité en coups par minute après incorporation de thymidine tritiée) et l'inhibition est déterminée comme suit :

$$I\% = (1 - (\text{nb de cellules en présence de produit}) / (\text{nb de cellules sans produit})) \times 100$$

10                    L'activité anticoagulante des différents produits a également été déterminée.

Le Tableau III ci-dessous résume les résultats obtenus pour deux DMCBSu ainsi que pour le dextrane natif et l'héparine.

TABLEAU III

Produit	Composition (ds)			Activité anti-coagulante (UI/mg)	I (%)
	MC	B	Su		
Dextrane	0	0	0	0	0
DMCBSu6	0,60	0,50	0,30	5,0	80
DMCBSu5	0,80	0,35	0,15	3,0	85
20 Héparine				173	80

Ces résultats montrent que pour les DMCBSu6 et DMCBSu5, l'inhibition de la croissance cellulaire des cellules musculaires lisses est comparable, voire supérieure, à celle de l'héparine. Cependant, ces deux produits présentent une activité anticoagulante nettement inférieure à celle de l'héparine.

25    **EXEMPLE 9 : Potentialisation de la croissance cellulaire en présence de facteurs de croissances *Fibroblast Growth Factor* (FGF).**

L'évaluation de l'activité proliférative des DMCBSu a été réalisée sur 2 lignées cellulaires :

Les CCL39 : lignée fibroblastique de poumon de hamster chinois.

30                    Les CEVCOH : cellules endothéliales de la veine du cordon ombilicale humain.

Les essais de croissance sont effectués en maintenant les cellules en

carence, c'est-à-dire dans un milieu de culture contenant 0% ou 2 % de sérum de veau foetal, puis en incorporant le produit à étudier à différentes concentrations.

Les comptages sont effectués à l'aide d'un compteur automatique ou par mesure de la radioactivité en coups par minute après incorporation de thymidine tritiée.

La capacité des produits à potentialiser et à protéger certains facteurs de croissance comme les FGF est évaluée selon le protocole suivant.

L'activité mitogénique des FGF étudiés est mesurée par un test d'activité biologique (test dose réponse) afin de déterminer la DE 50 (quantité de facteur de croissance nécessaire pour obtenir la moitié de l'incorporation maximale de la thymidine tritiée par les cellules).

Cette DE 50 est de 5 ng/ml pour les CCL39 et de 2 ng/ml pour les CEVCOH.

Ces valeurs de DE 50 sont utilisées pour la suite des études.

Pour les CEVCOH, l'association FGF (2 ng/ml) avec 400 µg/ml de DMCBSu5 a le même pouvoir mitogénique que le FGF seul à 20 ng/ml.

Pour les CCL39, en absence de DMCBSu la DE 50 est de l'ordre de 5 ng/ml de FGF. En présence de 1000 µg/ml de DMCBSu1, la DE 50 diminue à 0,8 ng/ml.

Ces résultats montrent l'effet de potentialisation des facteurs de croissance cellulaire considérés par les DMCBSu. Cet effet est lié à la composition chimique globale des produits. Le Tableau donne, par exemple, la composition chimique globale de DMCBSu particulièrement actifs.

#### COMPOSITIONS DES DMCBSu (en ds)

	MC	B	Su
DMCBSu1	0,75	0,20	0,15
DMCBSu5	0,80	0,35	0,15
DMCBSu3	1,10	0,40	0,40

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui



viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

### REVENDECATIONS

1°) Dérivés de dextrane de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , dans laquelle :

D représente une chaîne polysaccharidique, de préférence constituée  
5 par des enchaînements d'unités glucosidiques,  
MC représente des groupes méthylcarboxylates,  
B représente des groupes carboxyméthylbenzylamides,  
Su représente des groupes sulfates,  
S représente des groupes sulfonates,  
10  $a$ ,  $b$ ,  $c$  et  $d$  représentent le degré de substitution (ds), respectivement  
en groupements MC, B, Su et S ;  $a$  étant égal à 0 ou  $\geq 0,3$ ,  $b$  étant égal à 0 ou  $\geq 0,1$ ,  $c$  étant  $\geq 0,1$  et  $d$  étant égal à 0 ou  $\leq 0,15$ , à condition que lorsque  $d=0$ ,  $a$  et/ou  
 $b$  sont  $\neq 0$ , lesquels produits présentent une homogénéité de la distribution des tailles  
de chaînes, illustrée par un profil d'élution de type gaussien symétrique en chromato-  
15 graphie d'exclusion stérique haute performance et une homogénéité de la distribution  
des groupements chimiques chargés, illustrée par un profil d'élution à un seul pic symé-  
trique en chromatographie d'échange d'ions basse pression.

2°) Dérivés de dextrane, de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , selon la  
revendication 1, caractérisé en ce que  $a \geq 0,6$ ,  $b \neq 0$ ,  $c \leq 0,5$  et  $d \leq 0,15$  ou égal à 0 et  
20 en ce que leur masse molaire est comprise entre 3.000 et 500.000 g/mole, pour une  
utilisation essentiellement comme agent cicatrisant.

3°) Dérivés de dextrane, de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , selon la  
revendication 1, caractérisés en ce que  $a \geq 0,3$ ,  $c \leq 0,4$  et  $d \leq 0,15$  ou égal à 0 et en ce  
que leur masse molaire est comprise entre 10.000 et 60.000 g/mole, pour une utiliza-  
25 tion essentiellement comme agent à activité anti-complémentaire et substitut du plasma.

4°) Dérivés de dextrane, de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , selon la  
revendication 1, caractérisés en ce que  $a \geq 0,5$ ,  $b \neq 0$ ,  $c \leq 0,4$  et  $d \leq 0,15$  ou égal à 0 et  
en ce que leur masse molaire est comprise entre 3.000 et 100.000 g/mole, pour une  
utilisation essentiellement comme agent modulateur de la prolifération cellulaire.

30 5°) Dérivés de dextrane, de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , selon la  
revendication 1, caractérisés en ce que  $a \geq 0,4$ ,  $b \neq 0$ ,  $c \geq 0,3$  et  $d \leq 0,15$  ou égal à 0 et

en ce que leur masse molaire est comprise entre 3.000 et 20.000 g/mole, pour une utilisation essentiellement comme agent anticoagulant.

6°) Médicaments, caractérisés en ce qu'ils comprennent comme principe actif au moins un dérivé de dextrane selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, éventuellement associé à un autre principe actif et/ou à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et/ou un support physiologiquement acceptable (liposome).

7°) Procédé de préparation de dérivés du dextrane de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$  selon l'une quelconque des revendication 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) **carboxyméthylation** comprenant (i) l'activation d'un dextrane non substitué, par mise en contact dudit dextrane avec un milieu hydro-alcoolique liquide biphasique basique pendant au moins 1 h sous agitation, (ii) addition de l'acide monochloroacétique au produit activé obtenu, à une température comprise entre 40 et 90°C, de préférence à 60°C, le rapport  $R_{MC}$ , égal au nombre de moles d'acide monochloroacétique/nombre de moles d'OH étant compris entre 0,3 et 2, (iii) isolement et éventuellement purification du dextrane méthylcarboxylate (DMC) obtenu.

b) **couplage de la benzylamine sur les groupes méthylcarboxylates** comprenant (i) la mise en contact, pendant au moins 2 h et en milieu aqueux acide, du DMC obtenu en a) avec de la benzylamine, en présence d'une carbodiimide hydrosoluble comme agent de couplage, à une température comprise entre 0°C et 30°C, le rapport molaire CMC/MC étant compris entre 0,25 et 2 et le rapport molaire benzylamine/MC étant compris entre 0,25 et 2, (ii) l'isolement du dextrane méthylcarboxyle benzylamide (DMCB) obtenu et éventuellement sa purification.

c) **sulfatation** comprenant (i) la formation d'un sel de trialkylammonium du DMCB obtenu en b), (ii) la solubilisation du sel obtenu dans un solvant polaire anhydre, généralement une base de Lewis, telle que le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou la diméthylformamide (DMF) et (iii) l'ajout audit sel en solution, d'un complexe à base de trioxyde de soufre tel que  $SO_3$ -pyridine,  $SO_3$ -triéthylamine ou  $SO_3$ -DMF en solution dans le même solvant, à température inférieure à 70°C, le rapport molaire complexe à base de trioxyde de soufre/OH libres étant compris entre 0,25 et 12, et éventuellement

d) une étape de sulfonation des groupes B par mélange sous agitation d'un dérivé DMCBSu en suspension dans un solvant anhydre avec de l'acide chlorosulfonique en solution dans le même solvant, à température comprise entre la température ambiante et la température d'ébullition du solvant utilisé.

5 8°) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'à l'étape a), le rapport eau:alcool dudit milieu hydro-alcoolique liquide biphasique est compris entre 10:90 (v/v) et 25:75 (v/v), et est de préférence de 15:85 (v/v).

9°) Procédé selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisé en ce que la carbodiimide hydrosoluble de l'étape b) est sélectionnée dans le  
10 groupe constitué par le 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl)-carbodiimide méta-*p*-toluène sulfonate (CMC) et le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylamino-propyl)-carbodiimide (EDC).

10°) Procédé de préparation des dérivés de dextrane selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , dans laquelle  
15  $a = 0$  ou  $a \neq 0$ ,  $b$  est différent de 0 et  $d = 0$ , caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) préparation de N-méthyl phényl 2-chloroacétamide par mise en contact de benzylamine avec du chlorure de chloroacétyle, puis isolement et purification du produit,

20 b) mise en contact de dextrane en solution hydro-alcoolique basique avec successivement le N-méthyl phényl 2-chloroacétamide en solution alcoolique obtenu en a) en présence ou non d'acide monochloroacétique en solution alcoolique, maintien du mélange obtenu à une température supérieure à 40°C, de préférence à 60°C, puis isolement et éventuellement purification du DB ou du DMCB obtenu, et

25 c) sulfatation du produit obtenu en b) comprenant (i) la formation d'un sel de trialkylammonium, (ii) la solubilisation du sel obtenu dans un solvant polaire anhydre, généralement une base de LEWIS, telle que le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou la diméthylformamide (DMF), (iii) l'ajout audit sel en solution, d'un complexe à base de trioxyde de soufre tel que  $SO_3$ -pyridine,  $SO_3$ -triéthylamine ou  $SO_3$ -  
30 DMF en solution dans le même solvant, à température inférieure à 70°C, le rapport

molaire complexe à base de trioxyde de soufre/OH libres étant compris entre 0,25 et 12 et (iv) l'isolement et éventuellement la purification du DBSu ou du DMCBSu obtenu.

11°) Procédé de préparation des dérivés de dextrane de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$ , selon la revendication 1, dans laquelle  $a$  est différent de 0,  $b =$   
5 0 et  $d = 0$ , caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

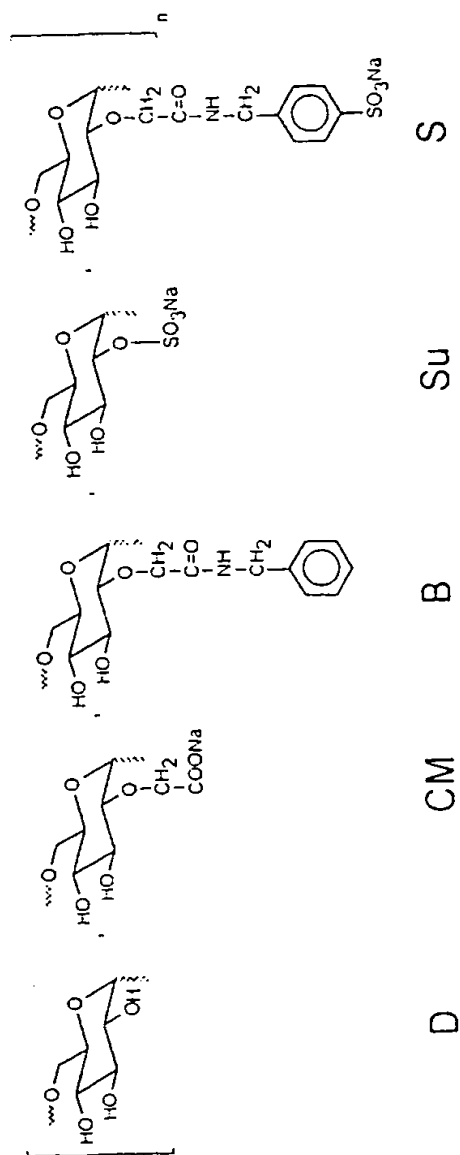
a) **carboxyméthylation** d'un dextrane non substitué, dans les conditions exposées à la revendication 7 et

b) **sulfatation** du DMC obtenu en a) dans les conditions exposées à la revendication 7.

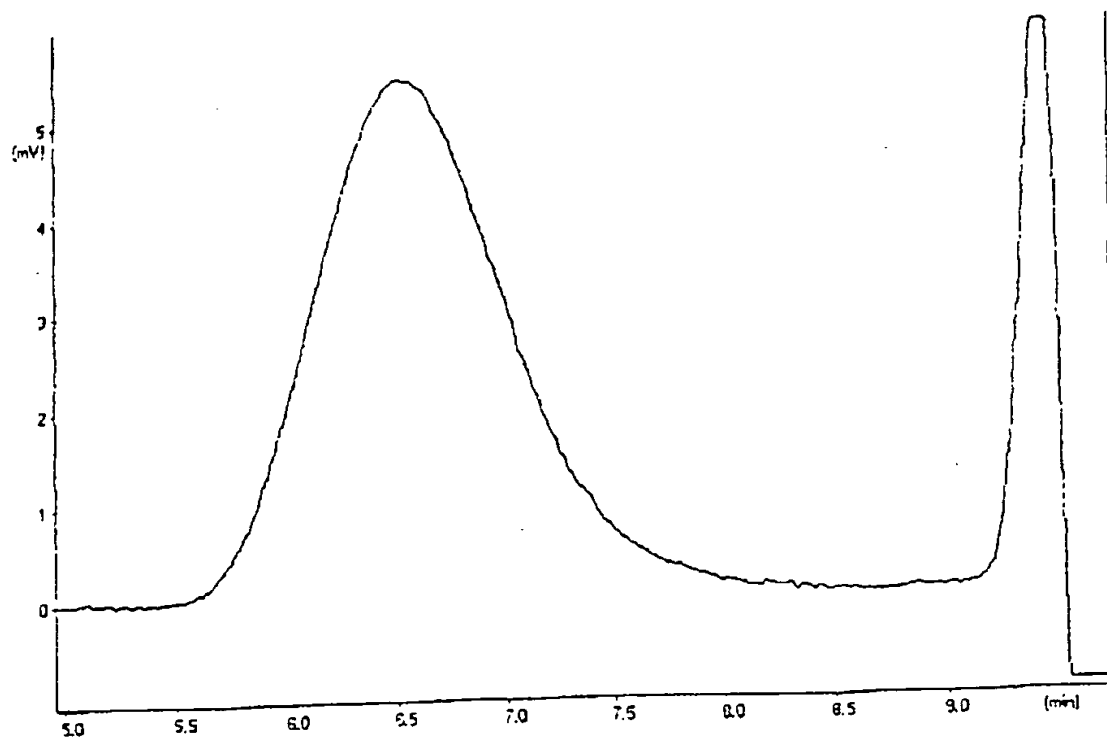
10 12°) Dextrane carboxyméthyl benzylamide de formule  $DMCaBb$  dans le cas où  $a \neq 0$  et  $b \neq 0$ , en tant que produit intermédiaire pour la préparation d'un dérivé de dextrane de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$  selon la revendication 1.

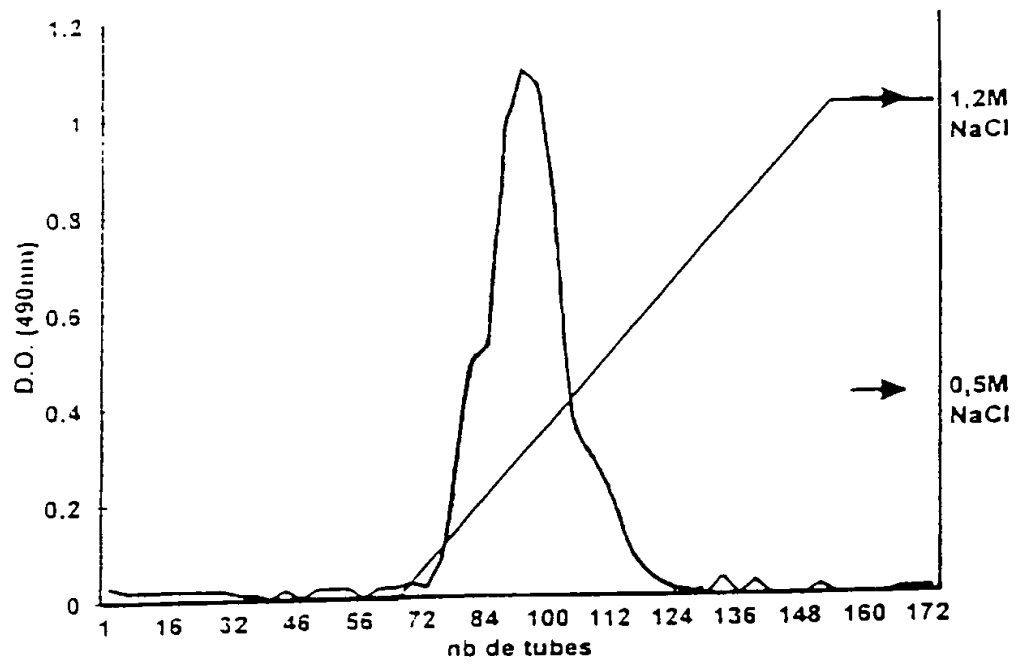
13°) Dextrane benzylamide (DB) en tant que produit intermédiaire pour la préparation d'un dérivé de dextrane de formule générale  $DMC_aB_bSu_cS_d$  selon  
15 les revendications 1 et 10.

14°) Dérivé du dextrane selon la revendication 12, pour une utilisation comme agent à activité anti-complémentaire.

FIGURE 1

2/3

FIGURE 2





INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 551881  
FR 9715702

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A,D	O. MAIGA-REVEL ET AL.: "New investigations on heparin-like derivatized dextrans: CMDBS, synergistic role of benzylamide and sulfate substituents in anticoagulant activity" CARBOHYDRATE POLYMERS, vol. 32, 1997, pages 89-93, XP000686949 ---	1,3-5,7
A	EP 0 146 455 A (CHOAY S.A.) 26 mai 1985 * page 1, ligne 3 - ligne 6 * * exemples * ---	1,3,5-7, 12,14
A	WO 91 12011 A (THERAPEUTIQUES SUBSTITUTIVES) 22 août 1991 * revendications * D & EP 0 514 449 A ---	1,4,6,7, 12
A	EP 0 023 854 A (FOUGNOT ET AL.) 11 février 1981 * abrégé * ---	1,5-7
A	WO 90 10456 A (THERAPEUTIQUES SUBSTITUTIVES) 20 septembre 1990 * abrégé; revendications * ---	1,2,6,7
A	FR 2 651 436 A (SANOFI) 8 mars 1991 * abrégé; revendications; exemple 1 * ---	1,4,12
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 78, no. 1, 8 janvier 1973 Columbus, Ohio, US; abstract no. 4485, XP002076097 * abrégé * & JP 47 020 117 A (SEIKAGAKU KOGYO CO. LTD.) 27 septembre 1972 ---	7
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
1 septembre 1998		Mazet, J-F
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

# RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 551881  
FR 9715702

[illegible]